

U. PORTO

FMUP FACULDADE DE MEDICINA
UNIVERSIDADE DO PORTO

MESTRADO INTEGRADO EM MEDICINA

2018/2019

Catarina Isabel Lopes Ferreira
Terapias Moduladoras do CFTR na
Fibrose Quística
CFTR Modulating Therapies for
Cystic Fibrosis

março, 2019

FMUP

Catarina Isabel Lopes Ferreira
Terapias Moduladoras do CFTR na
Fibrose Quística
CFTR Modulating Therapies for
Cystic Fibrosis

Mestrado Integrado em Medicina

Área: Pneumologia
Tipologia: Monografia

Trabalho efetuado sob a Orientação de:
Dra. Adelina Amorim

Trabalho organizado de acordo com as normas da revista:
Pulmonology

março, 2019

Eu, **Catarina Isabel Lopes Ferreira**, abaixo assinado, nº mecanográfico **201304499**, estudante do 6º ano do Ciclo de Estudos Integrado em Medicina, na Faculdade de Medicina da Universidade do Porto, declaro ter atuado com absoluta integridade na elaboração deste projeto de opção.

Neste sentido, confirmo que **NÃO** incorri em plágio (ato pelo qual um indivíduo, mesmo por omissão, assume a autoria de um determinado trabalho intelectual, ou partes dele). Mais declaro que todas as frases que retirei de trabalhos anteriores pertencentes a outros autores, foram referenciadas, ou redigidas com novas palavras, tendo colocado, neste caso, a citação da fonte bibliográfica.

Faculdade de Medicina da Universidade do Porto, 18/03/19

Assinatura conforme cartão de identificação:

Catarina Ferreira

NOME

Catarina Isabel Lopes Ferreira

NÚMERO DE ESTUDANTE

201304499

E-MAIL

cilferreira31@gmail.com

DESIGNAÇÃO DA ÁREA DO PROJECTO

Pneumologia

TÍTULO DISSERTAÇÃO/MONOGRAFIA (riscar o que não interessa)

Terapias Moduladoras do CFTR na Fibrose Quística

ORIENTADOR

Adelina Amorim

COORIENTADOR (se aplicável)

ASSINALE APENAS UMA DAS OPÇÕES:

| | |
|---|-------------------------------------|
| É AUTORIZADA A REPRODUÇÃO INTEGRAL DESTES TRABALHOS APENAS PARA EFEITOS DE INVESTIGAÇÃO, MEDIANTE DECLARAÇÃO ESCRITA DO INTERESSADO, QUE A TAL SE COMPROMETE. | <input checked="" type="checkbox"/> |
| É AUTORIZADA A REPRODUÇÃO PARCIAL DESTES TRABALHOS (INDICAR, CASO TAL SEJA NECESSÁRIO, Nº MÁXIMO DE PÁGINAS, ILUSTRAÇÕES, GRÁFICOS, ETC.) APENAS PARA EFEITOS DE INVESTIGAÇÃO, MEDIANTE DECLARAÇÃO ESCRITA DO INTERESSADO, QUE A TAL SE COMPROMETE. | <input type="checkbox"/> |
| DE ACORDO COM A LEGISLAÇÃO EM VIGOR, (INDICAR, CASO TAL SEJA NECESSÁRIO, Nº MÁXIMO DE PÁGINAS, ILUSTRAÇÕES, GRÁFICOS, ETC.) NÃO É PERMITIDA A REPRODUÇÃO DE QUALQUER PARTE DESTES TRABALHOS. | <input type="checkbox"/> |

Faculdade de Medicina da Universidade do Porto, 18/03/19

Assinatura conforme cartão de identificação: Catarina Ferreira

Terapias Moduladoras do CFTR na Fibrose Quística

CFTR Modulating Therapies for Cystic Fibrosis

Catarina Ferreira¹, Adelina Amorim^{1,2}

Faculdade de Medicina da Universidade do Porto¹

Serviço de Pneumologia, Centro Hospitalar Universitário São João²

Alameda Professor Hernâni Monteiro, 4200 - 319 Porto, Portugal^{1,2}

Autor Correspondente:

Catarina Ferreira

Alameda Professor Hernâni Monteiro,

4200 - 319 Porto, Portugal

E-mail: cilferreira31@gmail.com

Telemóvel: 932330794

RESUMO

A Fibrose Quística é a doença hereditária mais frequente na raça caucasiana, de transmissão autossômica recessiva, com uma prevalência de cerca de 75 000 indivíduos portadores da doença em todo o mundo. Etiologicamente deve-se a uma deficiência no gene que codifica a proteína *Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator* (CFTR), localizado no braço longo do cromossoma 7. Atualmente, estão descritas mais de 2000 variantes genéticas desta proteína, contudo apenas cerca de 10% foram caracterizadas como mutações causadoras de doença.

A proteína CFTR tem como função principal atuar como um canal iónico de cloro, sendo expresso ao nível de múltiplos tecidos. A sua disfunção desencadeia uma série de eventos como o aumento da viscosidade das secreções, fenómenos de obstrução e infeção e, conseqüentemente, destruição tecidular. A heterogeneidade na forma de apresentação e evolução da doença refletem-se na existência de diferentes fenótipos clínicos, motivo pelo qual é uma boa candidata a medicina personalizada.

Desde a descoberta do gene responsável pela doença que se ambiciona encontrar terapêuticas que visem a correção do defeito básico da molécula, existindo até ao momento duas abordagens – a terapêutica génica, com vista a corrigir a alteração genética e sem resultados positivos até à data, e a terapêutica molecular, com o objetivo de corrigir funcionalmente a proteína e que tem mostrado resultados promissores.

Dada a evolução natural desta doença e o aumento da sua esperança média de vida, atualmente superior aos 50 anos em alguns países, tem sido associado à FQ um número crescente de comorbilidades. Portanto, o reconhecimento completo da fisiopatologia e a otimização das diferentes modalidades terapêuticas continua altamente relevante para estes doentes.

Palavras-chave: Fibrose Quística, CFTR, terapias moduladoras CFTR, Ivacaftor, Lumacaftor, Tezacaftor.

ABSTRACT

Cystic Fibrosis is the most common hereditary disease in the Caucasian race. It has an autosomal recessive transmission, with about 75,000 individuals worldwide with the disease. Etiologically it is due to a deficiency in the gene that encodes the *Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator* (CFTR) protein, located on the long arm of chromosome 7. Nowadays, more than 2000 genetic variants of this protein are described, however only about 10% can cause the disease.

This protein functions as a chloride membrane anionic channel and it is expressed at the level of multiple tissues. Its dysfunction triggers a series of events such as increased viscosity of secretions, obstruction and infection events and, consequently, tissue destruction. The disease presentation and evolution are very heterogeneous, which reflects the different phenotypes in cystic fibrosis, which is why it is a good candidate for personalized medicine.

Since the discovery of the responsible gene for the disease, the main goal is to find therapies aimed at correcting the basic defect of the molecule. Currently, there are two different approaches: (1) correction of the genetic defect, with no results so far, and (2) the correction of the molecular defect, with promising results.

Given the cystic fibrosis natural history and the predicted average life expectancy growth – today is over 50 years old in some countries – the number of comorbidities has increased remarkably. Therefore, looking for a complete knowledge of cystic fibrosis pathophysiology and a clinical approach optimization remains highly relevant for these patients.

Keywords: Cystic Fibrosis, CFTR, CFTR modulator therapies, Ivacaftor, Lumacaftor, Tezacaftor.

ÍNDICE REMISSIVO

| | |
|-------------------------------------|----|
| LISTA DE ABREVIATURAS | 4 |
| INTRODUÇÃO | 5 |
| MATERIAL E MÉTODOS | 10 |
| POTENCIADOR DA CFTR – IVACAFTOR | 11 |
| CORRETOR DA CFTR – LUMACAFTOR | 16 |
| ASSOCIAÇÃO LUMACAFTOR COM IVACAFTOR | 17 |
| CORRETOR DA CFTR – TEZACAFTOR | 21 |
| TERAPIA COMBINADA TRIPLA | 24 |
| ATALUREN | 26 |
| CONCLUSÃO | 27 |
| REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS | 28 |
| AGRADECIMENTOS | 32 |
| ANEXOS | 33 |

LISTA DE ABREVIATURAS

cAMP – Adenosina Monofosfato cíclica

CFQ-R – *Cystic Fibrosis Questionnaire-Revised*

CFTR – *Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator*

FDA – *Food Drug Administration*

FEV1 – *Forced Expiratory Volume in 1 second*

FQ – Fibrose Quística

INTRODUÇÃO

A fibrose quística (FQ), descrita pela primeira vez em 1938, é a doença hereditária mais frequente na raça caucasiana, afetando aproximadamente 75 000 indivíduos em todo o mundo. Tem uma transmissão autossómica recessiva e resulta de uma mutação no gene *Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator* (CFTR), localizado no braço longo do cromossoma 7.^{1,2}

A fisiopatologia da FQ apresenta-se como um processo multissistémico caracterizado pela tríade clássica de sintomas: infeção do trato respiratório superior e inferior, insuficiência pancreática exócrina e aumento da concentração de sódio e cloro no suor.³

Durante as últimas 6 décadas, a idade média de sobrevida desta doença tem aumentado progressivamente. Neste momento, os doentes vivem, em média, 41,6 anos nos EUA e 51,8 anos no Canadá, não havendo dados atualizados sobre Portugal ou sobre a Europa, no geral.⁴ A insuficiência respiratória secundária à doença pulmonar crónica é atualmente, a principal causa de morte em indivíduos que não recebem um transplante pulmonar, correspondendo a 59% da totalidade de mortes em doentes com FQ.⁵

O gene CFTR, clonado em 1989, codifica uma proteína com o mesmo nome constituída por dois domínios transmembranares (TM1 e TM2), dois domínios de ligação de nucleotídeos (NB1 e NB2), que ligam e hidrolisam o ATP, e ainda um domínio regulador (R), dependendo a sua funcionalidade das interações entre os vários domínios.²

A proteína CFTR tem como função atuar como canal de cloro regulado por cAMP (adenosina monofosfato cíclica), embora tenha também importância na regulação do transporte de sódio e bicarbonato.² A proteína é essencial para o funcionamento de múltiplos tecidos, relacionando-se a fisiopatologia da doença diretamente com a

expressão desta na superfície apical das vias aéreas, do trato gastrointestinal (incluindo os ductos pancreáticos e biliares), glândulas sudoríparas e sistema geniturinário. Ao nível do trato respiratório, o defeito da CFTR provoca uma diminuição na secreção do ião cloro e, simultaneamente, leva a uma hiperatividade do canal de sódio epitelial (ENaC), o que culmina em um aumento na absorção de sódio. Consequentemente, devido aos mecanismos osmóticos, ocorre uma diminuição do volume de líquido periciliar, o que torna as secreções cada vez mais viscosas e compactas, comprometendo a ação do aparelho mucociliar e constituindo um ambiente propício para o desenvolvimento de infecção.⁶

Mais de 2000 variantes genéticas do gene CFTR foram identificadas a nível mundial, contudo apenas cerca de 10% estão claramente definidas como sendo mutações causadoras da doença.^{4,5} Com base em estudos funcionais, as mutações foram classificadas em seis classes. As mutações de classe I resultam numa ausência total da proteína CFTR e são essencialmente mutações *non-sense* com codões de terminação prematuros e, consequentemente, um ARN truncado e instável. Nas mutações de classe II, a CFTR é sintetizada mas não sofre um processo de maturação e migração adequados até à membrana, pelo que o mecanismo de controlo primário executado pelo retículo endoplasmático retém e degrada precocemente a proteína. As mutações de classe III resultam de alterações nos domínios NB1 e NB2 e ainda no domínio R, com consequente redução da resposta ao ATP por diminuição da sua ligação à CFTR. Este defeito de ativação dos canais de cloro resulta num tempo de abertura anormalmente reduzido. Em relação à classe IV, identificam-se moléculas de CFTR na superfície celular mas o fluxo de eletrólitos através dos canais iónicos é menor (diminuição da condutância) por alteração dos domínios TM1 e TM2. As alterações genéticas da classe V levam a uma redução importante dos níveis normais da proteína CFTR devido ao *splicing* alternativo que condiciona a formação de ARNm aberrante. Por fim, nas mutações da classe VI a proteína normal atinge a superfície apical da célula

tendo, no entanto, um índice de degradação maior devido à perda da extremidade COOH da proteína, o que diminui a estabilidade da molécula.^{3,6-8}

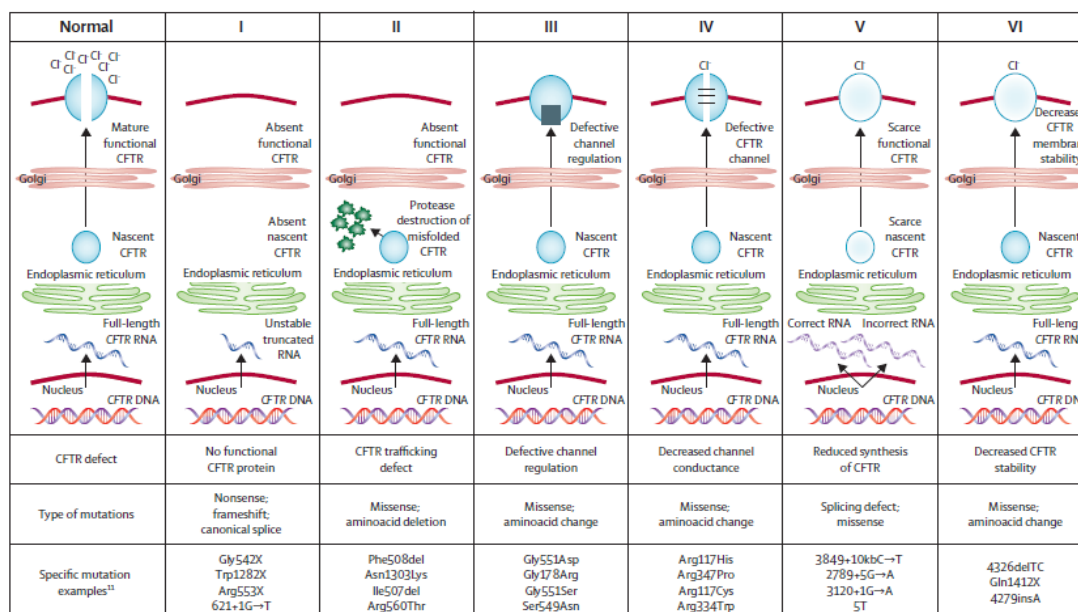


Figura 1 – Classes de mutação da proteína CFTR.

Reproduzido a partir de *Boyle e Boeck*.⁹

As mutações das classes I, II e III são caracteristicamente mutações com função mínima do canal CFTR, isto é, com pouca ou nenhuma presença e/ou atividade do canal a nível da membrana celular, pelo que estão usualmente associadas a um fenótipo mais grave com insuficiência pancreática e doença severa. Por outro lado, as mutações das classes IV, V e VI estão frequentemente associadas a função residual do canal, no qual a proteína está presente na superfície celular e parcialmente funcional. Deste modo, os doentes portadores destas mutações apresentam um fenótipo mais moderado da doença, no qual a insuficiência pancreática é incomum e o risco de infeção por múltiplos organismos encontra-se diminuído em comparação com os anteriores.^{10,11}

Para tornar este sistema de classificações ainda mais complexo, certas mutações podem resultar em defeitos de mais do que uma classe funcional como, por exemplo, a mutação F508del, a mais comum, presente em cerca de 85% dos casos.³ Classicamente é uma mutação de classe II, mas apresenta simultaneamente características das mutações de classe III. Isto é, por um lado, a proteína mutada é

degradada no retículo endoplasmático e, por outro, sabe-se que atingindo a membrana apical tem um tempo de abertura reduzido.^{1,7}

Desde a descoberta do gene responsável pela doença que se ambiciona encontrar terapêuticas que visem a correção do defeito básico da molécula. Tanto a terapêutica génica, com vista a corrigir a alteração genética, como a terapêutica molecular, visando a correção funcional ao nível da proteína, têm sido alvo de grandes investigações. Até há muito pouco tempo o tratamento da FQ era meramente sintomático, baseado no uso de enzimas de substituição pancreática, complexos vitamínicos ADEK, broncodilatadores, mucolíticos, antibióticos, solução salina hipertónica e medidas cinesiterapia respiratória, tornando-o complexo, cansativo e muito exigente do ponto de vista do doente e do cuidador.⁷

No respeitante à terapêutica génica, os resultados têm sido pouco promissores porque independentemente do vetor utilizado, a duração da expressão do gene por este introduzido é muito reduzida.¹²

No que diz respeito à terapêutica molecular, um entendimento cada vez mais sofisticado da genética molecular e da bioquímica da proteína membrana CFTR tem facilitado a descoberta de novos fármacos, principalmente para as mutações das classes I, II e III. Neste sentido, para as mutações da classe I foi estudado uma molécula, o ataluren, um análogo dos aminoglicosídeos já usado na Distrofia Muscular de Duchenne, que permite a não leitura de codões STOP pelos ribossomas, com a formação de proteínas de tamanho normal e funcionais. No âmbito das mutações da classe II surgiram os denominados “corretores”, de que são exemplos o lumacaftor e o tezacaftor, que facilitam a migração da proteína CFTR para a membrana celular. Por fim, no que se refere às mutações da classe III, surgiram os “potenciadores”, representados pelo ivacaftor, que aumentam o tempo de abertura dos canais de cloro,

permitindo aos íões fluir para a superfície celular. Há ainda diversos agentes farmacológicos em fase de ensaios clínicos.^{12,13}

De uma forma geral, o objetivo desta revisão é sistematizar a informação existente relativamente a esta nova classe farmacológica para o tratamento da FQ, nomeadamente no que diz respeito à eficácia, segurança, modo de utilização e população-alvo dos fármacos já aprovados, e ainda explorar os estudos em vigor para outros fármacos da mesma classe.

MATERIAL E MÉTODOS

A elaboração da presente revisão foi baseada numa bibliografia que resultou da pesquisa na base de dados eletrónica *MEDLINE-PubMed*, com recurso às palavras-chave: *cystic fibrosis*, *CFTR*, *CFTR modulator therapies*, *Ivacaftor*, *Lumacaftor* e *Tezacaftor*. A pesquisa foi efetuada entre Abril de 2018 e Dezembro de 2018, tendo sido excluídos artigos que não estivessem escritos em língua inglesa e/ou portuguesa, artigos mais antigos que 2010 ou que estivessem fora do âmbito temático desta revisão.

Foi dada maior importância a artigos baseados em ensaios clínicos de fase II e fase III, no entanto foram também incluídos artigos de revisão e meta-análises. Dos artigos selecionados, a escolha foi feita com base no título e resumo, sendo que subsequentemente foram consultados os artigos mencionados nas referências bibliográficas. Utilizaram-se ainda orientações de prática clínica referidas oportunamente ao longo deste trabalho.

POTENCIADOR DA CFTR – IVACAFTOR

Ivacaftor, previamente conhecido por VX-770 e desenvolvido pela farmacêutica Vertex, foi o primeiro potenciador do canal CFTR a ser aprovado para uso clínico, em 2012, com o nome comercial de KALYDECO®. Esta é uma pequena molécula que demonstrou, *in vitro*, ser capaz de restaurar a função do canal ao aumentar o seu tempo de ativação (abertura do canal). O seu maior efeito foi encontrado em células com a mutação G551D, a mais comum da classe III, correspondendo a cerca de 5% de todas as mutações do gene CFTR.¹²⁻¹⁴

Um primeiro estudo de fase II avaliou a segurança, eficácia e efeitos adversos do fármaco durante 14 a 28 dias de tratamento. A semelhança de efeitos adversos entre os dois grupos de estudo (placebo vs ivacaftor) e o perfil de segurança observado permitiram suportar estudos clínicos adicionais. Foram também estudadas as doses do fármaco, tendo-se concluído que os pacientes que receberam a dose de 150mg a cada 12 horas foram os que melhor responderam, pelo que esta foi a dose escolhida para o estudos de fase III.¹⁵

Dois estudos de fase III serviram de base à aprovação deste fármaco: STRIVE (161 doentes com 12 ou mais anos) e ENVISION (52 doentes entre os 6 e os 11 anos). Ambos os estudos foram randomizados, controlados por placebo e duplamente cegos, nos quais o grupo de intervenção recebeu 150mg de ivacaftor a cada 12 horas durante 48 semanas. Em ambos os estudos o objetivo primário foi a variação absoluta em relação ao valor basal na percentagem de FEV1 (*Forced Expiratory Volume in 1 second*) às 24 semanas. Como objetivos secundários foram avaliados a variação em relação ao valor basal na percentagem de FEV1 às 48 semanas, a alteração de peso, a variação na concentração de cloro no suor e ainda os sintomas respiratórios avaliados através do *Cystic Fibrosis Questionnaire-Revised* (CFQ-R) – instrumento validado para a avaliação dos sintomas respiratórios dos doentes com FQ com uma escala de 0 a 100 pontos, com números mais altos a indicar um menor efeito dos sintomas na qualidade

de vida dos pacientes. O STRIVE tinha também como objetivo secundário a avaliação do tempo até à primeira exacerbação. A segurança do fármaco foi novamente avaliada.^{16,17}

Qualquer um dos estudos demonstrou uma melhoria estatisticamente significativa da função pulmonar e, em ambos, as melhorias foram reportadas a partir do 15º dia. No STRIVE, os participantes demonstraram uma melhoria absoluta de 10,6% no valor de FEV1 às 24 semanas e de 10,5% às 48 semanas. Já no ENVISION esta melhoria foi de 12,5% e de 10% às 24 e às 48 semanas, respetivamente.^{16,17}

No STRIVE observou-se ainda uma redução em 55% no que diz respeito às exacerbações pulmonares no grupo do ivacaftor em comparação com o grupo do placebo. Também no primeiro grupo verificou-se que o número de exacerbações com necessidade de tratamento endovenoso foi significativamente menor, bem como o tempo de hospitalização.¹⁶

Em ambos os estudos, no que diz respeito ao nível de cloretos no suor, registou-se uma grande diferença em relação ao placebo – uma diminuição de 47,9 mmol/L no STRIVE e de 54,3mmol/L no ENVISION – atingindo numa grande maioria de doentes valores abaixo dos 60 mmol/L, valor acima do qual se faz o diagnóstico de FQ.^{16,17}

No respeitante aos questionários de qualidade de vida, houve um aumento de 8,6 pontos nos doentes do grupo do ivacaftor em relação ao placebo nos doentes mais velhos (STRIVE) e um aumento de 5,1 pontos nos doentes menores de 12 anos (ENVISION), ambos estatisticamente significativos. A menor diferença no ENVISION é explicada pelo facto de o valor basal nos CFQ-R ser mais elevado nos pacientes mais novos, o que sugere que estes têm sintomas mais moderados.^{16,17}

No que diz respeito à segurança do medicamento, os efeitos adversos mais comuns foram cefaleias, congestão nasal, infeções respiratórias altas, exantemas e tonturas. No geral, a incidência de efeitos adversos foi semelhante nos dois grupos.

Efeitos adversos mais graves como exacerbações pulmonares, tosse, hemoptises e diminuição significativa da função pulmonar ocorreram com menor frequência no grupo da intervenção. No estudo STRIVE, estes ocorreram num total de 24% no grupo do fármaco e em 42% no grupo do placebo. Já no estudo ENVISON, estes valores foram de 19,2 e 23,1%, respetivamente.^{16,17}

Os participantes dos dois estudos anteriores foram convidados a participar num outro estudo – estudo PERSIST – durante um período de mais 96 semanas, com o objetivo de estudar os benefícios a longo prazo do mesmo fármaco. Participaram no estudo um total de 192 doentes – 144 doentes com 12 ou mais anos e 48 com idade entre os 6 e os 11 anos. Os adolescentes e adultos que tinham recebido placebo no primeiro estudo demonstraram, neste estudo, melhorias na percentagem de FEV1, ganho de peso e diminuição da taxa de exacerbações pulmonares semelhantes aos resultados alcançados pelo grupo do ivacaftor nas 48 semanas dos ensaios clínicos respetivos.¹⁸

Mais recentemente, em 2017, um outro estudo – estudo CORK – corroborou os dados anteriormente apresentados e demonstrou também que o ivacaftor diminuiu significativamente a infeção por *Pseudomonas aeruginosa*, assim como os marcadores inflamatórios. Este fármaco pode, portanto, alterar a história natural da doença, com um grande impacto no prognóstico.¹⁹

Em 2014, foi ainda realizado um estudo de eficácia – estudo KONNECTION – para 9 outras mutações da classe III, sendo que para 8 delas (G178R, S549N, S549R, G551S, G1244E, S1251N, S1255P e G1349D) verificou-se um aumento de 10,7% do FEV1 às 8 semanas, melhoria dos sintomas reportados pelo doente (+9,6 pontos no CFQ-R) e ainda uma diminuição no nível de cloro no suor (-49,2 mmol/L), motivando em 2014 a aprovação do medicamento para o tratamento da doença em indivíduos com estas mutações.²⁰

Em 2015, com base no estudo KONDUCT, o ivacaftor foi também aprovado para o tratamento de doentes com a mutação R117H, uma vez que, apesar de não haver evidência de melhoria significativa na percentagem de FEV1, existiu uma diferença razoável nos questionários de qualidade de vida e diminuição do nível de cloro no suor.²¹

O ivacaftor foi também testado em pacientes com o genótipo mais comum da doença, F508del (estudo DISCOVER), contudo conclui-se que um potenciador da CFTR em monoterapia não é uma estratégia terapêutica eficaz para doentes que sejam homozigóticos para a mutação em questão.²²

Por fim, o medicamento foi igualmente estudado para a população pediátrica dos 2 aos 6 anos – estudo KIWI – no que diz respeito a segurança e tolerância, com efeitos semelhantes aos verificados para a população maior de 6 anos, pelo que o ivacaftor foi também aprovado para esta faixa etária em 2016.²³

Os principais resultados dos ensaios clínicos de fase III supracitados encontram-se na tabela 1.

Contudo, apesar de os estudos mostrarem benefícios inequívocos em relação ao ivacaftor – a atividade do canal CFTR atinge 35 a 40% da atividade da proteína normal – só cerca de 10% dos pacientes com FQ são alvo desta terapêutica.¹²⁻¹⁴

| | STRIVE, 2011 | ENVISION, 2011 | KONNECTION, 2014 | KONDUCT, 2015 | KIWI, 2016 |
|--|-----------------|-------------------|---|------------------|--|
| Mutação estudada (heterozigotia) | G551D | G551D | G178R, S549N, S549R, G551S, G970R [#] , G1244E, S1251N, S1255P, G1349D | R117H | G178R, S549N, S549R, G551D, G551S, G970R, G1244E, S1251N, S1255P, G1349D |
| Nº participantes | 161 | 52 | 39 | 69 | 34 |
| Idade (anos) | ≥ 12 | 6 a 11 | ≥ 6 | ≥ 6 | 2 a 6 |
| Duração (semanas) | 48 | 48 | 24 | 24 | 24 |
| Variação absoluta FEV1 (%) | +10,5* | +10* | +10,7* | +2,1* | -- |
| Peso (Kg) | +2,7* | +2,8* | -- | sem alteração | -- |
| IMC (Kg/m²) | -- | +0,45* | +0,7* | sem alteração | +0,4* |
| [Cl⁻] no suor (mmol/L) | -47,9* | -54,3* | -49,2* | -24,2* | -47,1* |
| CFQ-R (pontos) | +8,6* | +5,1* | +9,6* | +8,4* | -- |
| Ano de aprovação¹ | 2012 | 2012 | 2014 | 2015 | 2016 |

Tabela 1 – Resultados dos ensaios clínicos de fase III que permitiram a aprovação do Ivacaftor

CFQ-R – *Cystic Fibrosis Questionnaire-Revised*; FEV1 – *Forced Expiratory Volume in 1 second*; IMC – Índice de Massa Corporal.

¹Ano de aprovação do fármaco para a indicação proposta de acordo com o respetivo ensaio clínico.

*Valores estatisticamente significativos (p<0,001).

[#]Para a mutação G970R não foram obtidos resultados estatisticamente significativos – não incluída na lista final de indicações do fármaco.

CORRETOR DA CFTR – LUMACAFITOR

Nos doentes com mutações da classe II o objetivo terapêutico é a correção do transporte anormal da CFTR para a membrana celular. Assim, os fármacos ditos corretores, como é o caso do lumacaftor, ao promoverem a maturação adequada da proteína, previnem a sua degradação precoce no retículo endoplasmático e consequentemente aumentam o seu transporte até à membrana celular.¹² Esta molécula, testada *in vitro* em células de doentes com FQ homozigóticas para a mutação F508del, mostrou melhorar o processamento da proteína, tornando-a mais resistente à degradação, o que culminou em um aumento de cerca de 14% na secreção de cloro em células do epitélio brônquico.¹⁴

No entanto, quando estudado em pacientes, a única diferença estatisticamente significativa verificada foi nos níveis de cloro no suor, inexistindo significância estatística na variação da percentagem de FEV1 ou nos questionários de qualidade de vida. Isto pode ser justificado pelo mecanismo da mutação F508del, uma vez que mesmo corrigido o problema do processamento, continua a existir um tempo de abertura reduzido. Este estudo possibilitou também a avaliação da segurança e tolerabilidade do fármaco, sendo que cefaleias, dispneia e tosse foram os efeitos adversos mais frequentes.²⁴

ASSOCIAÇÃO LUMACAFITOR COM IVACAFITOR

Tendo em conta o mecanismo de ação de cada um dos fármacos individualmente, a combinação lumacaftor/ivacaftor possibilitaria a correção do defeito de processamento e a migração das proteínas CFTR para a superfície celular (lumacaftor), assim como amplificaria o transporte de cloro como resultado de um aumento no tempo de abertura dos canais (ivacaftor). Colocou-se então a hipótese de que esta associação pudesse ser eficaz para doentes homozigóticos para a mutação F508del.¹⁴

Foram realizados dois estudos (TRAFFIC e TRANSPORT) de fase III, randomizados, duplamente cegos, controlados por placebo, para avaliarem a eficácia e segurança da combinação lumacaftor/ivacaftor em pacientes com idade igual ou superior a 12 anos e homozigóticos para a mutação F508del. No total, 1108 doentes receberam placebo ou uma de duas doses de lumacaftor (400mg de 12 em 12 horas ou 600mg uma vez por dia) associado a ivacaftor (250mg de 12 em 12 horas), por via oral, durante 24 semanas.²⁵

O objetivo primário de ambos os estudos consistiu na variação absoluta da percentagem de FEV1 às 24 semanas. Os objetivos secundários foram a variação relativa na percentagem do FEV1 (calculada pela média da variação às 16 e 24 semanas de tratamento), a variação no índice de massa corporal, a variação nos sintomas respiratórios avaliados pelo CFQ-R, a percentagem de pacientes com uma variação relativa no FEV1 de 5% ou mais, e o número de exacerbações pulmonares ao longo do estudo. Foi também avaliado o número de doentes que necessitaram de hospitalização ou de tratamento com antibióticos por via endovenosa. Por fim, estudou-se novamente a segurança dos fármacos.²⁵

Quanto ao objetivo primário, a variação absoluta na percentagem de FEV1 foi de 2,6 a 4% no estudo TRAFFIC e de 2,6 a 3% no estudo TRANSPORT. No que se refere

à variação relativa do FEV1, esta foi entre 4,3 e 6,7% no primeiro e entre 4,4 e 5,3% no segundo. O aumento no índice de massa corporal variou entre 0,13 e 0,41 kg/m², tendo significância estatística apenas no estudo TRANSPORT. A taxa de exacerbações pulmonares reduziu entre 30 e 39% na globalidade de ambos os estudos, favorecendo a dose de 400mg de 12 em 12 horas. Existiu ainda uma diminuição significativa no número de doentes que necessitaram de hospitalização ou antibioterapia endovenosa (redução em 61 e em 56%, respetivamente). A percentagem de doentes que teve uma variação de 5% ou mais no FEV1 não foi estatisticamente significativa, apesar de superior no grupo medicado com a associação. A variação verificada nos questionários de qualidade de vida apenas teve significância estatística no estudo TRAFFIC para a dose de 600mg uma vez por dia.²⁵

Quanto ao perfil de segurança, é importante referir que este foi semelhante entre os dois regimes terapêuticos e concordante com o verificado nos estudos de fase II, embora a percentagem de doentes que descontinuaram o estudo tenha sido superior no grupo a fazer a associação farmacológica (4.2% *versus* 1.6% no grupo placebo). Os efeitos adversos mais comuns nos grupos que receberam a associação foram dispneia (13 a 14,9%) e aperto torácico (8,7 a 10,8%). A elevação das enzimas hepáticas (AST e ALT) foi semelhante em ambos os grupos (5.2% no grupo da associação *versus* 5.1% nos que receberam placebo), não se tendo verificado eventos adversos graves a nível hepático no grupo do placebo. Já no grupo sob lumacaftor/ivacaftor, tais eventos ocorreram em 7 dos participantes. Em 6 dos 7 doentes, a função hepática normalizou com a descontinuação dos fármacos.²⁵

Com base nos resultados destes estudos, a *Food and Drug Administration* (FDA) aprovou em 2015 a primeira terapia combinada para pacientes com 12 ou mais anos e homozigóticos para a mutação F508del, com o nome comercial de ORKAMBI®.²⁶ Contudo, é difícil ignorar a discrepância entre os resultados obtidos nos estudos realizados para o ivacaftor em mutações de classe III e a associação do ivacaftor com

o lumacaftor em mutações de classe II. Tal pode ser justificado pelo facto do lumacaftor ser um potente indutor da CYP3A4 e o ivacaftor ser um substrato da mesma enzima, pelo que interações medicamentosas estão provavelmente na origem dos resultados modestos que se verificaram nos ensaios TRAFFIC e TRANSPORT.²⁶

Mais recentemente, um ensaio adicional de fase III estudou a combinação lumacaftor/ivacaftor em pacientes homozigóticos para a mesma mutação com idades entre os 6 e os 11 anos, contando com um total de 58 participantes durante 24 semanas de tratamento.²⁷ Não foram reportados eventos adversos graves no que se refere ao perfil de segurança e tolerabilidade. Já no que diz respeito à variação absoluta do FEV1, esta não se verificou estatisticamente significativa, contudo às 24 semanas do estudo verificou-se um aumento significativo do índice de massa corporal que variou entre 0,08 e 0,22 Kg/m² e ainda uma redução da concentração de cloro no suor de 24,8 mmol/L. Também aqui existiu uma melhoria na qualidade de vida dos participantes avaliada através do questionário CFQ-R, tendo-se observado um aumento de 5,4 pontos em relação ao valor basal.²⁷ Um estudo subsequente, com uma população maior e controlado por placebo, na mesma faixa etária, relatou novamente um perfil de segurança semelhante ao verificado nos estudos TRAFFIC e TRANSPORT e um aumento modesto da percentagem de FEV1 – variação absoluta de 1,1%.²⁸ Estes resultados permitiram que em 2016 o ORKAMBI® fosse aprovado para a população com idade compreendida entre os 6 e os 11 anos.²⁹

Dados de um estudo de fase III recentemente concluído em crianças com idade entre os 2 e os 5 anos e homozigóticas para a mutação F508del mostraram que a associação lumacaftor/ivacaftor era segura e bem tolerada, com reduções significativas dos níveis de cloro no suor e ainda melhorias da função pancreática, conforme medido pela elastase fecal.³⁰ Este estudo permitiu que em agosto de 2018 a população alvo da associação aqui descrita fosse alargada para doentes com idade compreendida entre os 2 e os 5 anos.²⁹

Os principais resultados dos ensaios clínicos de fase III supracitados encontram-se na tabela 2.

| | TRAFFIC, 2015 | TRANSPORT, 2015 | Milla, CE., 2016 | Mcnamara, J., 2018 |
|--|--------------------------|----------------------------|-----------------------------|-------------------------------|
| Mutação estudada (homozigotia) | F508del | F508del | F508del | F508del |
| Nº participantes | 559 | 563 | 58 | 60 |
| Idade (anos) | ≥ 12 | ≥ 12 | 6 a 11 | 2 a 5 |
| Duração estudo (semanas) | 24 | 24 | 24 | 24 |
| Variação absoluta FEV1 (%) | +2,6* | +3,0* | +2,5 | +0,5 |
| Variação relativa FEV1 (%) | +4,3* | +5,3* | -- | -- |
| IMC (Kg/m²) | +0,13 | +0,36* | +0,15* | +0,27* |
| [Cl⁻] no suor (mmol/L) | -- | -- | -24,8* | -31,7* |
| CFQ-R (pontos) | +1,5 | +2,9 | +5,4* | -- |
| Ano de aprovação¹ | 2015 | 2015 | 2016 | 2018 |

Tabela 2 – Resultados dos ensaios clínicos de fase III que permitiram a aprovação da associação Ivacaftor/Lumacaftor

CFQ-R – *Cystic Fibrosis Questionnaire-Revised*; FEV1 – *Forced Expiratory Volume in 1 second*; IMC – Índice de Massa Corporal.

¹Ano de aprovação do fármaco para a indicação proposta de acordo com o respetivo ensaio clínico.

*Valores estatisticamente significativos (p<0,001).

CORRETOR DA CFTR – TEZACAFTOR

O tezacaftor, também conhecido como VX-661, foi a segunda molécula corretora da proteína CFTR a ser estudada em ensaios clínicos. Estruturalmente é semelhante ao lumacaftor, tendo também como mecanismo de ação melhorar o processamento da proteína mutada e o seu transporte até à superfície da célula.³¹

O tezacaftor foi introduzido em ensaios clínicos como uma alternativa ao lumacaftor, com a vantagem de não ser um indutor das enzimas CYP3A4 e, portanto, não interferir com outros medicamentos que são utilizados na FQ, particularmente o ivacaftor.³¹ A segurança e a eficácia desta molécula em combinação com o ivacaftor foram avaliadas em um ensaio de fase II para doentes homozigóticos para a mutação F508del ou heterozigóticos com a mutação F508del e uma segunda mutação G551D.^{31,32}

Após dados promissores da fase II, a combinação tezacaftor/ivacaftor foi avaliada em ensaios de fase III em pacientes com diferentes genótipos. EVOLVE foi um ensaio com a duração de 24 semanas, aleatorizado, controlado por placebo, para avaliar a segurança e a eficácia da combinação em doentes homozigóticos para a mutação F508del com idade igual ou superior a 12 anos.³² O estudo EXPAND teve um desenho de estudo mais complexo, com o objetivo de avaliar a segurança e a eficácia da mesma associação farmacológica em doentes com idade igual ou superior a 12 anos e com mutações com função residual do canal.³³

EVOLVE e EXPAND atingiram os seus objetivos primários com um aumento absoluto na percentagem de FEV1 de 4,0 e 6,8%, respetivamente, acompanhados de melhorias em vários objetivos secundários, nomeadamente uma redução de 35% na taxa de exacerbação pulmonar no grupo de tratamento no estudo EVOLVE. Também nos questionários de qualidade de vida se verificou uma melhoria significativa com um

aumento de 5,1 e 11,1 pontos nos estudos EVOLVE e EXPAND, respetivamente (tabela 3).^{32,33}

Quer nos estudos de fase II, quer nos estudos de fase III, o tratamento com tezacaftor teve menos eventos adversos respiratórios quando comparado com os ensaios anteriores com lumacaftor, revelando-se uma alternativa atraente à terapia previamente aprovada.^{31–33}

A combinação tezacaftor/ivacaftor recebeu aprovação da FDA em fevereiro de 2018, com o nome comercial de SYMDEKO®, e espera-se que seja uma importante alternativa de tratamento em pacientes homozigóticos para a mutação F508del que nunca iniciaram o ORKAMBI® ou o descontinuaram por intolerância, assim como para doentes com mutações com função residual que não respondam à monoterapia com KALYDECO®.³⁴

Ensaio de fase III para esta associação estão atualmente a decorrer em crianças entre os 6 e os 11 anos de idade que sejam homozigóticas para a mutação F508del ou heterozigóticas com a mutação F508del e uma segunda mutação com função residual.²⁹

| | EVOLVE, 2017 | EXPAND, 2017 |
|--|-------------------------|---|
| Mutação estudada | F508del/FR08del | F508del/ mutação com função residual |
| Nº participantes | 510 | 248 |
| Idade (anos) | ≥ 12 | ≥ 12 |
| Duração estudo (semanas) | 24 | 24 |
| Variação absoluta FEV1 (%) | +4,0* | +6,8* |
| Variação relativa FEV1 (%) | +6,8* | +11,4* |
| IMC (Kg/m²) | +0,06 | +0,34* |
| [Cl⁻] no suor (mmol/L) | -10,1* | -9,5* |
| CFQ-R (pontos) | +5,1* | +11,1* |
| Ano de aprovação do fármaco¹ | 2018 | 2018 |

Tabela 3 – Resultados dos ensaios clínicos de fase III que permitiram a aprovação da associação Ivacaftor/Tezacaftor

CFQ-R – *Cystic Fibrosis Questionnaire-Revised*; FEV1 – *Forced Expiratory Volume in 1 second*; IMC – Índice de Massa Corporal.

¹Ano de aprovação do fármaco para a indicação proposta de acordo com o respetivo ensaio clínico.

*Valores estatisticamente significativos (p<0,001).

TERAPIA COMBINADA TRIPLA

A terapia combinada com um corretor da CFTR (lumacftor ou tezacaftor) e um potenciador da mesma (ivacaftor) é atualmente o padrão de tratamento para os pacientes homozigóticos para a mutação F508del. No entanto, esta combinação não restaura totalmente a função da proteína e não é eficaz em paciente heterozigóticos com uma mutação F508del e uma segunda mutação com função residual do canal. Isto levou à percepção de que a correção da maturação da proteína provavelmente exigiria mais do que uma molécula corretora, culminando no desenvolvimento de combinações triplas compostas por dois corretores juntamente com um potenciador.³⁵

Neste seguimento, a Vertex selecionou quatro compostos (VX-445, VX-659, VX-440 e VX-152) que, em combinação com o tezacaftor/ivacaftor, foram submetidos a ensaios clínicos de fase II.³⁶ Estes compostos ligam-se a diferentes locais da proteína CFTR e mostraram ter um efeito sinérgico à terapia dupla em ensaios conduzidos *in vitro* com células epiteliais brônquicas humanas de pacientes com FQ.³⁵ Foram estudados dois grupos de pacientes: homozigóticos para a mutação F508del e heterozigóticos com uma mutação F508del e uma segunda mutação com função residual.^{37,38}

Embora os dados iniciais de segurança e eficácia tenham sido semelhantes entre os diferentes compostos – todas as combinações triplas foram geralmente bem toleradas e a maioria dos eventos adversos foram leves a moderados – as melhorias na percentagem de FEV1 de 13,3% (pacientes heterozigóticos) e de 9,7% (pacientes homozigóticos) com o composto VX-659 e de 13,8% (pacientes heterozigóticos) e de 11,0% (pacientes homozigóticos) com o composto VX-445 contribuíram para a seleção destas moléculas para os estudos de fase III subsequentes.³⁶ De referir ainda que em ambos os ensaios clínicos se verificou uma diminuição das concentrações de cloro no suor – cerca de 39mmol/L com o composto VX-445 em ambos os genótipos, e de 42,2mmol/L e 51,4 mmol/L com o composto VX-659 nos pacientes homozigóticos e

heterozigóticos, respetivamente. É de reportar também uma melhoria na qualidade de vida dos participantes avaliada através do questionário CFQ-R.^{37,38}

Desde o início de 2018 que tanto o VX-659 como o VX-445 estão disponíveis para ensaios de clínicos de fase III em regime de terapia tripla em pacientes com idade igual ou superior a 12 anos com duas cópias da mutação F508del ou com uma cópia desta mutação e uma segunda mutação com função mínima.³⁶

ATALUREN

Nas mutações de classe I, responsáveis por quase 10% dos casos da doença, o aumento da biossíntese de CFTR poderá ser obtida por agentes com a capacidade de ultrapassar os codões de terminação prematuros e assim permitir que a célula produza uma proteína completa e funcional.¹² Os aminoglicosídeos foram os primeiros a mostrar algum efeito nesta direção. Estes promovem uma leitura do ARNm através dos codões de terminação prematuros e, por isso favorecem a ligação de aminoácidos nesses locais, permitindo que a tradução continue normalmente. Um estudo com gentamicina de administração tópica nasal induziu alguma correção no transporte de cloro, contudo os efeitos laterais significativos, nomeadamente nefrotoxicidade e ototoxicidade, incitaram a procura por alternativas não tóxicas.¹²

O Ataluren (um medicamento aprovado para a Distrofia Muscular de Duchenne) foi desenvolvido devido ao seu mecanismo de ação semelhante. Assim, ao permitir ultrapassar a leitura dos codões de terminação prematuros por parte dos ribossomas, possibilita a formação de uma proteína de tamanho normal e, portanto, com função mantida.⁹ Partindo desta premissa, e após demonstrada segurança em estudos de fase II, realizou-se um estudo de fase III com participantes com idade igual ou superior a 6 anos que receberam o fármaco durante 48 semanas. O objetivo principal foi a variação relativa da percentagem de FEV1 às 48 semanas e o objetivo secundário foi a taxa de exacerbações pulmonares. No entanto, não foram observadas alterações estatisticamente significativas em ambos os parâmetros clínicos, pelo que ensaios clínicos adicionais foram descontinuados.³⁹

Ainda durante o decorrer do ano de 2018, a Eloxx Pharmaceuticals iniciou estudos de fase II para fármacos cujo alvo terapêutico são as mutações *non-sense* que caracterizam esta classe funcional do canal CFTR.⁴⁰

CONCLUSÃO

A última década tem sido entusiasmante para os doentes com FQ. É notório o benefício encontrado nas terapêuticas moduladoras da função da proteína CFTR, representando obviamente um enorme avanço na Medicina, conferindo na FQ, em particular, a possibilidade de alteração do curso e da história natural da doença.⁴⁰ No entanto, a morte continua a ser precoce, em média antes dos 50 anos, e o caminho para igualar a idade de sobrevivência da população geral ainda é longo.⁴ A principal causa de morte é efetivamente a insuficiência respiratória, pelo que a diminuição da progressão da doença pulmonar continua a ser o principal objetivo terapêutico para estes doentes.⁵

Dada a história natural destes doentes, com o desenvolvimento de inúmeras comorbidades à medida que a idade avança, é necessário um acompanhamento especializado e multidisciplinar que compreenda as particularidades das manifestações clínicas. Mais ainda se acrescenta que um tratamento definitivo provavelmente necessitará de ter início durante a infância, antes do aparecimento de danos estruturais irreversíveis como consequência da auto perpetuação da inflamação, infeção e distúrbios metabólicos característicos desta doença. Assim sendo, a inclusão de crianças em estudos e ensaios clínicos é absolutamente imperativa.⁴¹

A descoberta das terapias moduladoras trouxe uma perspetiva de redução da carga de tratamentos necessários para estes doentes. Contudo, a combinação com as terapêuticas clássicas continua a ser indispensável. Posto isto, embora revolucionários, estes medicamentos têm ainda um efeito modesto, pelo que são necessários mais estudos no sentido de desenvolver moléculas semelhantes mas com maior potencial terapêutico, bem como entender o potencial a longo prazo destas terapêuticas.⁴⁰

Os desafios futuros são a identificação de quaisquer doentes que possam beneficiar da intervenção terapêutica aprovada e conseguir desenvolver tratamentos otimizados para todos os doentes, independentemente da sua mutação. A investigação sobre moduladores da CFTR está longe do fim, mas é um caminho muito promissor.

Referências Bibliográficas

1. Fajac I, De Boeck K. New horizons for cystic fibrosis treatment. *Pharmacol Ther.* 2017;170:205-211.
2. Rowe SM, Miller S, Sorscher EJ. Mechanisms of disease Cystic Fibrosis. *N Engl J Med.* 2005;352:1992-2001.
3. Wiencek JR, Lo SF. Advances in the diagnosis and management of cystic fibrosis in the genomic era. *Clin Chem.* 2018;64(6):898-908.
4. Jackson AD, Goss CH. Epidemiology of CF: How registries can be used to advance our understanding of the CF population. *J Cyst Fibros.* 2018;17(3):297-305.
5. Orenti A, Naehrlich L, Van Rens J. ECFSPR Annual Report 2016. 2018. www.ecfs.eu/ecfspr.
6. Quon BS, Rowe SM. New and emerging targeted therapies for cystic fibrosis. *BMJ.* 2016;352:i859.
7. Elborn JS. Cystic fibrosis. *Lancet.* 2016;388(19):2519-2531.
8. Martiniano SL, Sagel SD, Zemanick ET. Cystic Fibrosis: a Model System for Precision Medicine. *Curr Opin Pediatr.* 2016;28(3):312-317.
9. Boyle MP, De Boeck K. A new era in the treatment of cystic fibrosis: Correction of the underlying CFTR defect. *Lancet Respir Med.* 2013;1:158-163.
10. Zielenski J. Genotype and Phenotype in Cystic Fibrosis. *Respiration.* 2000;67:117-133.
11. Green DM, McDougal KE, Blackman SM, et al. Mutations that permit residual CFTR function delay acquisition of multiple respiratory pathogens in CF patients. *Respir Res.* 2010;11(1):140-148.
12. Fajac I, Wainwright CE. New treatments targeting the basic defects in cystic fibrosis. *Press Medicale.* 2017;46:e165-e175.
13. Solomon G, Marshall S, Ramsey B, Rowe S. Breakthrough Therapies: Cystic Fibrosis (CF) Potentiators and Correctors. 2015;50(40):S3-S13.

14. Brodlie M, Haq IJ, Roberts K, Elborn JS. Targeted therapies to improve CFTR function in cystic fibrosis. *Genome Med.* 2015;7:101.
15. Accurso F, Rowe SM, Clancy JP, et al. Effect of VX-770 in Persons with Cystic Fibrosis and the G551D- CFTR Mutation. *N Engl J Med.* 2010;363(21):1991-2003.
16. Ramsey BW, Davies J, McElvaney GN, Tullis E, et al. A CFTR Potentiator in Patients with Cystic Fibrosis and the G551D Mutation. *N Engl J Med.* 2011;365(18):1663-1672.
17. Davies JC, Howenstine MS, Ahrens R, et al. Efficacy and Safety of Ivacaftor in Patients Aged 6 to 11 Years with Cystic Fibrosis with a G551D Mutation. *Am J Respir Crit Care Med.* 2013;187(11):1219-1225.
18. McKone EF, Borowitz D, Drevinek P, et al. Long-term safety and efficacy of ivacaftor in patients with cystic fibrosis who have the Gly551Asp-CFTR mutation: A phase 3, open-label extension study (PERSIST). *Lancet Respir Med.* 2014;2:902-910.
19. Ronan NJ, Einarsson GG, Twomey M, et al. CORK Study in Cystic Fibrosis. *Chest.* 2018;153(2):395-403.
20. De Boeck K, Munck A, Walker S, et al. Efficacy and safety of ivacaftor in patients with cystic fibrosis and a non-G551D gating mutation. *J Cyst Fibros.* 2014;13(6):674-680.
21. Moss RB, Flume PA, Elborn JS, et al. Efficacy and safety of ivacaftor treatment: randomized trial in subjects with cystic fibrosis who have an R117H-CFTR mutation. 2015;3(7):524-533.
22. Flume PA, Liou TG, Borowitz DS, et al. Ivacaftor in subjects with cystic fibrosis who are homozygous for the F508del-CFTR mutation. *Chest.* 2012;142(3):718-724.
23. Davies JC, Cunningham S, Harris WT, et al. Safety, pharmacokinetics, and pharmacodynamics of ivacaftor in patients aged 2-years with cystic fibrosis and a CFTR gating mutation (KIWI): An open-label, single-arm study. *Lancet Respir Med.* 2016;4(2):107-115.

24. Pettit R, Fellner C. CFTR Modulators for the Treatment of Cystic Fibrosis. *Annu Rep Med Chem*. 2014;39(7):500-511.
25. Wainwright CE, Elborn JS, Ramsey BW, et al. Lumacaftor–Ivacaftor in Patients with Cystic Fibrosis Homozygous for Phe508del CFTR. *N Engl J Med*. 2015;373(3):220-231.
26. Deeks ED. Lumacaftor/Ivacaftor: A Review in Cystic Fibrosis. *Drugs*. 2016;76(12):1191-1201.
27. Milla CE, Ratjen F, Waltz D, Liu F, Rosenfeld M, Marigowda G. Lumacaftor/Ivacaftor in Patients Aged 6–11 Years with Cystic Fibrosis and Homozygous for F508del-CFTR. *Am J Respir Crit Care Med*. 2017;195(7):912-920.
28. Ratjen F, Hug C, Marigowda G, et al. Efficacy and safety of lumacaftor and ivacaftor in patients aged 6–11 years with cystic fibrosis homozygous for F508del-CFTR : a randomised, placebo-controlled phase 3 trial. *Lancet Respir Med*. 2017;5(7):557-567.
29. Dobra R, Edmondson C, Hughes D, Martin I, Davies JC. Potentiators and Correctors in Paediatric Cystic Fibrosis Patients: A Narrative Review. *Pediatr Drugs*. 2018;20(6):555-566.
30. McNamara J, McColley SA, Owen CA, et al. A 2-part, phase 3 single-arm study to evaluate the safety and pharmacokinetics (PK) of lumacaftor ivacaftor (LUMIVA) combination therapy in patients (pts) aged 2–5 years with cystic fibrosis (CF) homozygous for the F508del-CFTR mutation [abstract]. *J Cyst Fibros*. 2018;17(S3):S2-3.
31. Donaldson SH, Pilewski JM, Griesse M, et al. Tezacaftor/ivacaftor in subjects with cystic fibrosis and F508del/F508del-CFTR or F508del/G551D-CFTR. *Am J Respir Crit Care Med*. 2018;197(2):214-224.
32. Taylor-Cousar JL, Munck A, McKone EF, et al. Tezacaftor–Ivacaftor in Patients with Cystic Fibrosis Homozygous for Phe508del. *N Engl J Med*. 2017;377(21):2013-2023.
33. Rowe SM, Daines C, et al. Tezacaftor–Ivacaftor in Residual-Function Heterozygotes with Cystic Fibrosis. *N Engl J Med*. 2017;377(21):2024-2035.

34. Vertex Pharmaceuticals. FDA Approves SYMDEKOTM (tezacaftor/ivacaftor and ivacaftor) to Treat the Underlying Cause of Cystic Fibrosis in People Ages 12 and Older with Certain Mutations in the CFTR Gene (NASDAQ:VRTX). 2018. <http://investors.vrtx.com/releasedetail.cfm?releaseid=1057241>.
35. Holguin F. Triple CFTR Modulator Therapy for Cystic Fibrosis. *N Engl J Med*. 2018;379:1671-1672.
36. Vertex Pharmaceuticals. Vertex Selects Two Next-Generation Correctors , VX-659 and VX-445 , to Advance into Phase 3 Development as Part of Two Different Triple Combination Regimens for People with Cystic Fibrosis. 2018. <http://www.businesswire.com/news/home/20180131006482/en/>.
37. Keating D, Marigowda G, Burr L, et al. VX-445–Tezacaftor–Ivacaftor in Patients with Cystic Fibrosis and One or Two Phe508del Alleles. *N Engl J Med*. 2018;379:1612-1620.
38. Davies JC, Moskowitz SM, Brown C, et al. VX-659–Tezacaftor–Ivacaftor in Patients with Cystic Fibrosis and One or Two Phe508del Alleles. *N Engl J Med*. 2018;379:1599-1611.
39. PTC Therapeutics. PTC Therapeutics Announces Results from Pivotal Phase 3 Clinical Trial of Ataluren in Patients Living with Nonsense Mutation Cystic Fibrosis. 2017:9-11. <http://www.prnewswire.com/news-releases/ptc-therapeutics-announces- results-from-pivotal-phase-3-clinical-trial-of-ataluren-in-patients-living-with-nonsense-mutation-cystic-fibrosis- 300416860.html%0ASOURCE>.
40. Burgener EB, Moss RB. Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator modulators. *Curr Opin Pediatr*. 2018;30(3):372-377.
41. Ronan NJ, Elborn JS, Plant BJ. Current and emerging comorbidities in cystic fibrosis. *Presse Med*. 2017;46(6):e125-e138.

AGRADECIMENTOS

Muito especialmente, aos meus pais e irmão pelo incentivo, carinho e ajuda...
Por sempre acreditarem na minha capacidade de crescimento.

À Dra. Adelina Amorim, orientadora desta monografia, desejo agradecer por todas as contribuições ao longo da realização deste trabalho, assim como o seu apoio e dedicação.

ANEXOS

ELSEVIER LICENSE TERMS AND CONDITIONS

Feb 20, 2019

This Agreement between Miss. Catarina Ferreira ("You") and Elsevier ("Elsevier") consists of your license details and the terms and conditions provided by Elsevier and Copyright Clearance Center.

| | |
|--|--|
| License Number | 4532940617740 |
| License date | Feb 20, 2019 |
| Licensed Content Publisher | Elsevier |
| Licensed Content Publication | The Lancet Respiratory Medicine |
| Licensed Content Title | A new era in the treatment of cystic fibrosis: correction of the underlying CFTR defect |
| Licensed Content Author | Michael P Boyle,Kris De Boeck |
| Licensed Content Date | Apr 1, 2013 |
| Licensed Content Volume | 1 |
| Licensed Content Issue | 2 |
| Licensed Content Pages | 6 |
| Start Page | 158 |
| End Page | 163 |
| Type of Use | reuse in a thesis/dissertation |
| Portion | figures/tables/illustrations |
| Number of figures/tables/illustrations | 1 |
| Format | electronic |
| Are you the author of this Elsevier article? | No |
| Will you be translating? | No |
| Original figure numbers | Figure 1. |
| Title of your thesis/dissertation | Modulating Therapies of CFTR in Cystic Fibrosis |
| Expected completion date | Mar 2019 |
| Estimated size (number of pages) | 12 |
| Requestor Location | Miss. Catarina Ferreira Travessa do Dr. Barros Matosinhos, 4465-038 Portugal Attn: Miss. Catarina Ferreira |
| Publisher Tax ID | GB 494 6272 12 |
| Total | 0.00 EUR |
| Terms and Conditions | |

INTRODUCTION

1. The publisher for this copyrighted material is Elsevier. By clicking "accept" in connection with completing this licensing transaction, you agree that the following terms and conditions apply to this transaction (along with the Billing and Payment terms and conditions

TABLE OF CONTENTS

| | | |
|---|--------------------------|------------|
| • | Description | p.1 |
| • | Editorial Board | p.1 |
| • | Guide for Authors | p.2 |



ISSN: 2531-0437

DESCRIPTION

Pulmonology is the official journal of the Portuguese Society of Pulmonology (Sociedade Portuguesa de Pneumologia/SPP). The journal publishes 6 issues per year, mainly about respiratory system diseases in adults and clinical research. This work can range from peer-reviewed original articles to review articles, editorials, and opinion articles. The journal is printed in English, and is freely available in its web page as well as in Medline and other databases.

EDITORIAL BOARD

Editor-in-Chief

Ántonio Morais, Serviço de Pneumologia, Centro Hospitalar de S. João, Porto, Portugal

Associate Editor

Tiago Alfaro, Universidade de Coimbra, Coimbra, Portugal

Venceslau Hespanhol, Centro Hospitalar de S. João, Porto, Portugal

Jessica Jones, University Hospital, Coimbra, Coimbra, Portugal

José Melo Cristino, Instituto de Microbiologia, Universidade de Lisboa, Lisboa, Portugal

Fátima Rodrigues, Centro Hospitalar Lisboa Norte, Lisboa, Portugal

Richard Staats, Hospital de Santa Maria, Lisboa, Portugal

Section Editor

John Laffey, National University of Ireland Galway, Galway, Ireland

Editorial Board Member

José Agostinho Marques, Serviço de Pneumologia, Centro Hospitalar de S. João, Porto, Portugal

Cristina Bárbara, Serviço Pneumologia, Centro Hospitalar Lisboa Norte, Lisboa, Portugal

António Bensabat Rendas, Universidade NOVA de Lisboa, Lisboa, Portugal

António Bugalho de Almeida, Allergy Centre, CUF Infante Santo Hospital, Lisboa, Portugal

Marta Drummond, Serviço de Pneumologia, Centro Hospitalar de S. João, Porto, Portugal

Raquel Duarte, Universidade do Porto, Porto, Portugal

Maria João Marques Gomes, Chronic Diseases Research Center (CEDOC), Lisboa, Portugal

Bárbara Parente, Centro Hospitalar Vila Nova De Gaia (CHVN), Porto, Portugal

Paula Pinto, Hospital Pulido Valente, Lisboa, Portugal

Henrique Queiroga, Serviço de Pneumologia, Centro Hospitalar de S. João, Porto, Portugal

Carlos Robalo Cordeiro, Pulmonology Dept., University Hospital, Coimbra, Coimbra, Portugal

João Carlos Winck, Faculty of Medicine, Universidade do Porto, Porto, Portugal

GUIDE FOR AUTHORS

INTRODUCTION

Pulmonology will consider for publication papers, (original articles or revisions, case reports, letters to the editor, commentaries etc) that are related directly or indirectly with the Respiratory System. The opinions expressed are exclusively the responsibility of the authors.

Only manuscripts containing original material which has not yet been published, wholly or partially (including tables and figures), and which have not been submitted to be published elsewhere, will be considered for publication. Before submitting manuscripts, authors must obtain all necessary authorizations for the publication of the submitted material.

Texts should be written in English.

Articles on original research: The text must not exceed 2500 words, excluding references and tables, and be organized into introduction, methods, results, discussion and conclusions, with a maximum of 4 tables and/or figures. In the materials and methods there must be a complete and appropriate reference to the statistical methods used and the results should be quite sufficiently explicit.

Review articles: *Pulmonology* publishes primarily review articles which have been requested by the editors. However, unsolicited articles submitted will be considered, particularly systematic reviews (meta-analysis). The text must not exceed 5000 words, excluding references and tables, with a maximum of 5 tables and/or figures in total. The reviews must be organized systematically in introduction, methods, results and discussion.

Short publications: Preliminary results or new findings could lead to short publications. The text should not exceed 1000 words, excluding references and tables, and be organized into introduction, methods, results and discussion, with a maximum of 2 tables and/or figures in total and up to 10 references. The short publications should be submitted with formal abstracts in English, of not more than 250 words.

Commentaries: Commentaries, essays, critical analyses or declarations of a position in relation to topics of interest in the area of health, particular the politics of health and medical education will be considered. The text must not exceed 900 words, excluding references and tables, and include a maximum of one table or figure. Commentaries do not require abstracts; they will normally be at the request of the editors.

Special articles: Where appropriate the editorial board may invite one or various authors to write an article on a subject of particular formative interest in achieving the priorities of the journal and where the subject matter is not being addressed by other areas of study (for example postgraduate study).

Clinical case studies (case reports): The text should not exceed 1200 words, excluding references and tables, with a maximum of 2 tables and/or figures in total. Clinical case studies should be submitted with formal abstracts in English, of not more than 120 words.

Depending on their interest and originality the clinical case studies may include a commentary/discussion by one of the editors or by an invited reviewer (**Clinical case study with discussion**).

Letters to the editor: Two types of letter to the editor are considered, clinical notes and correspondence.

Clinical notes stand for a very objective reporting of results of clinical observation or original research for which a detailed development is not appropriate. The text should not exceed 800 words, excluding references and tables, and can include a maximum of two tables or figures and up to 7 references.

Correspondence refers to a succinct commentaries on articles published in the Portuguese Journal of Pulmonology, preferably within the previous 6 months. In this case, the text should not exceed 500 words, excluding references and tables, and can include a maximum of one table or figure and up to 5 references.

Letters to the editor should not include abstracts.

In manuscripts signed by more than 6 authors (3 authors in the case of letters to the editor), there has to be an explicit explanation for such an extensive authorship.

Manuscripts submitted to *Pulmonology* must conform to the recommendations indicated here and must be accompanied by a covering letter. The Editorial Board will acknowledge receipt of manuscripts, supplying information as to the orientation category given to the relevant article. Whenever there are editorial recommendations to changes to the manuscripts sent, the authors should supply a new version with an explanation of changes made. Correspondence between the authors and the journal should be conducted electronically, by the Elsevier Editorial System (<http://ees.elsevier.com/rpp>).

BEFORE YOU BEGIN

Ethics in publishing

Please see our information pages on [Ethics in publishing](#) and [Ethical guidelines for journal publication](#).

Studies in humans and animals

If the work involves the use of human subjects, the author should ensure that the work described has been carried out in accordance with [The Code of Ethics of the World Medical Association](#) (Declaration of Helsinki) for experiments involving humans. The manuscript should be in line with the [Recommendations for the Conduct, Reporting, Editing and Publication of Scholarly Work in Medical Journals](#) and aim for the inclusion of representative human populations (sex, age and ethnicity) as per those recommendations. The terms [sex and gender](#) should be used correctly.

Authors should include a statement in the manuscript that informed consent was obtained for experimentation with human subjects. The privacy rights of human subjects must always be observed.

All animal experiments should comply with the [ARRIVE guidelines](#) and should be carried out in accordance with the U.K. Animals (Scientific Procedures) Act, 1986 and associated guidelines, [EU Directive 2010/63/EU for animal experiments](#), or the National Institutes of Health guide for the care and use of Laboratory animals (NIH Publications No. 8023, revised 1978) and the authors should clearly indicate in the manuscript that such guidelines have been followed. The sex of animals must be indicated, and where appropriate, the influence (or association) of sex on the results of the study.

Declaration of interest

All authors must disclose any financial and personal relationships with other people or organizations that could inappropriately influence (bias) their work. Examples of potential competing interests include employment, consultancies, stock ownership, honoraria, paid expert testimony, patent applications/registrations, and grants or other funding. Authors must disclose any interests in two places: 1. A summary declaration of interest statement in the title page file (if double-blind) or the manuscript file (if single-blind). If there are no interests to declare then please state this: 'Declarations of interest: none'. This summary statement will be ultimately published if the article is accepted. 2. Detailed disclosures as part of a separate Declaration of Interest form, which forms part of the journal's official records. It is important for potential interests to be declared in both places and that the information matches. [More information](#).

Submission declaration and verification

Submission of an article implies that the work described has not been published previously (except in the form of an abstract, a published lecture or academic thesis, see '[Multiple, redundant or concurrent publication](#)' for more information), that it is not under consideration for publication elsewhere, that its publication is approved by all authors and tacitly or explicitly by the responsible authorities where the work was carried out, and that, if accepted, it will not be published elsewhere in the same form, in English or in any other language, including electronically without the written consent of the copyright-holder. To verify originality, your article may be checked by the originality detection service [Crossref Similarity Check](#).

Use of inclusive language

Inclusive language acknowledges diversity, conveys respect to all people, is sensitive to differences, and promotes equal opportunities. Articles should make no assumptions about the beliefs or commitments of any reader, should contain nothing which might imply that one individual is superior to another on the grounds of race, sex, culture or any other characteristic, and should use inclusive language throughout. Authors should ensure that writing is free from bias, for instance by using 'he or she', 'his/her' instead of 'he' or 'his', and by making use of job titles that are free of stereotyping (e.g. 'chairperson' instead of 'chairman' and 'flight attendant' instead of 'stewardess').

Authorship

All authors should have made substantial contributions to all of the following: (1) the conception and design of the study, or acquisition of data, or analysis and interpretation of data, (2) drafting the article or revising it critically for important intellectual content, (3) final approval of the version to be submitted.

It is necessary to specify in the covering letter the contribution made by each author to the work. Example: *António Costa conceived this study and supervised all aspects of its implementation. José Costa collaborated in the inception of the study and carried out the analysis of the data. Manuel Costa collected the data and collaborated in the analysis. All the authors contributed to the interpretation of the results and the proof reading of the manuscript.*

Changes to authorship

Authors are expected to consider carefully the list and order of authors **before** submitting their manuscript and provide the definitive list of authors at the time of the original submission. Any addition, deletion or rearrangement of author names in the authorship list should be made only **before** the manuscript has been accepted and only if approved by the journal Editor. To request such a change, the Editor must receive the following from the **corresponding author**: (a) the reason for the change in author list and (b) written confirmation (e-mail, letter) from all authors that they agree with the addition, removal or rearrangement. In the case of addition or removal of authors, this includes confirmation from the author being added or removed.

Only in exceptional circumstances will the Editor consider the addition, deletion or rearrangement of authors **after** the manuscript has been accepted. While the Editor considers the request, publication of the manuscript will be suspended. If the manuscript has already been published in an online issue, any requests approved by the Editor will result in a corrigendum.

Clinical trial results

In line with the position of the International Committee of Medical Journal Editors, the journal will not consider results posted in the same clinical trials registry in which primary registration resides to be prior publication if the results posted are presented in the form of a brief structured (less than 500 words) abstract or table. However, divulging results in other circumstances (e.g., investors' meetings) is discouraged and may jeopardise consideration of the manuscript. Authors should fully disclose all posting in registries of results of the same or closely related work.

Reporting clinical trials

Randomized controlled trials should be presented according to the CONSORT guidelines. At manuscript submission, authors must provide the CONSORT checklist accompanied by a flow diagram that illustrates the progress of patients through the trial, including recruitment, enrollment, randomization, withdrawal and completion, and a detailed description of the randomization procedure. The [CONSORT checklist and template flow diagram](#) are available online.

Registration of clinical trials

Registration in a public trials registry is a condition for publication of clinical trials in this journal in accordance with [International Committee of Medical Journal Editors](#) recommendations. Trials must register at or before the onset of patient enrolment. The clinical trial registration number should be included at the end of the abstract of the article. A clinical trial is defined as any research study that prospectively assigns human participants or groups of humans to one or more health-related interventions to evaluate the effects of health outcomes. Health-related interventions include any intervention used to modify a biomedical or health-related outcome (for example drugs, surgical procedures, devices, behavioural treatments, dietary interventions, and process-of-care changes). Health outcomes include any biomedical or health-related measures obtained in patients or participants, including pharmacokinetic measures and adverse events. Purely observational studies (those in which the assignment of the medical intervention is not at the discretion of the investigator) will not require registration.

Copyright

Upon acceptance of an article, authors will be asked to complete a 'Journal Publishing Agreement' (see [more information](#) on this). An e-mail will be sent to the corresponding author confirming receipt of the manuscript together with a 'Journal Publishing Agreement' form or a link to the online version of this agreement.

Author rights

As an author you (or your employer or institution) have certain rights to reuse your work. [More information](#).

Elsevier supports responsible sharing

Find out how you can [share your research](#) published in Elsevier journals.

Role of the funding source

You are requested to identify who provided financial support for the conduct of the research and/or preparation of the article and to briefly describe the role of the sponsor(s), if any, in study design; in the collection, analysis and interpretation of data; in the writing of the report; and in the decision to submit the article for publication. If the funding source(s) had no such involvement then this should be stated.

Funding body agreements and policies

Elsevier has established a number of agreements with funding bodies which allow authors to comply with their funder's open access policies. Some funding bodies will reimburse the author for the gold open access publication fee. Details of [existing agreements](#) are available online.

Open access

This is an open access journal: all articles will be immediately and permanently free for everyone to read and download. To provide open access, this journal has an open access fee (also known as an article publishing charge APC) which needs to be paid by the authors or on their behalf e.g. by their research funder or institution. Permitted third party (re)use is defined by the following [Creative Commons user licenses](#):

Creative Commons Attribution-NonCommercial-NoDerivs (CC BY-NC-ND)

For non-commercial purposes, lets others distribute and copy the article, and to include in a collective work (such as an anthology), as long as they credit the author(s) and provided they do not alter or modify the article.

Green open access

Authors can share their research in a variety of different ways and Elsevier has a number of green open access options available. We recommend authors see our [open access page](#) for further information. Authors can also self-archive their manuscripts immediately and enable public access from their institution's repository after an embargo period. This is the version that has been accepted for publication and which typically includes author-incorporated changes suggested during submission, peer review and in editor-author communications. Embargo period: For subscription articles, an appropriate amount of time is needed for journals to deliver value to subscribing customers before an article becomes freely available to the public. This is the embargo period and it begins from the date the article is formally published online in its final and fully citable form. [Find out more](#).

This journal has an embargo period of 12 months.

Language (usage and editing services)

Please write your text in good English (American or British usage is accepted, but not a mixture of these). Authors who feel their English language manuscript may require editing to eliminate possible grammatical or spelling errors and to conform to correct scientific English may wish to use the [English Language Editing service](#) available from Elsevier's WebShop.

Informed consent and patient details

Studies on patients or volunteers require ethics committee approval and informed consent, which should be documented in the paper. Appropriate consents, permissions and releases must be obtained where an author wishes to include case details or other personal information or images of patients and any other individuals in an Elsevier publication. Written consents must be retained by the author but copies should not be provided to the journal. Only if specifically requested by the journal in exceptional circumstances (for example if a legal issue arises) the author must provide copies of the consents or evidence that such consents have been obtained. For more information, please review the [Elsevier Policy on the Use of Images or Personal Information of Patients or other Individuals](#). Unless you have written permission from the patient (or, where applicable, the next of kin), the personal details of any patient included in any part of the article and in any supplementary materials (including all illustrations and videos) must be removed before submission.

Submission

Our online submission system guides you stepwise through the process of entering your article details and uploading your files. The system converts your article files to a single PDF file used in the peer-review process. Editable files (e.g., Word, LaTeX) are required to typeset your article for final publication. All correspondence, including notification of the Editor's decision and requests for revision, is sent by e-mail.

Submit your article

Please submit your article via <https://ees.elsevier.com/pulmoe>.

All manuscripts are evaluated by members of the editorial board of the journal and acceptance for publication of articles or original research, clinical reports or series of case studies which are accepted, are subject to a technical assessment by the editorial board. In this evaluation process articles may be:

- a) Accepted without alteration
- b) Accepted after suggested modifications have been agreed by the authors
- c) Refused

Modifications and revisions – In the case of articles being accepted subject to modifications, changes must be made by the author within fifteen days (for “minor” modifications) or 2 months (for “major” modifications). The proof reading will be the responsibility of the Editorial Board unless the authors indicate otherwise. In the latter case the changes must be made within the time limit set by the Editorial Board, to comply with.

PREPARATION

Peer review

This journal operates a single blind review process. All contributions will be initially assessed by the editor for suitability for the journal. Papers deemed suitable are then typically sent to a minimum of two independent expert reviewers to assess the scientific quality of the paper. The Editor is responsible for the final decision regarding acceptance or rejection of articles. The Editor's decision is final. [More information on types of peer review.](#)

Use of word processing software

It is important that the file be saved in the native format of the word processor used. The text should be in single-column format. Keep the layout of the text as simple as possible. Most formatting codes will be removed and replaced on processing the article. In particular, do not use the word processor's options to justify text or to hyphenate words. However, do use bold face, italics, subscripts, superscripts etc. When preparing tables, if you are using a table grid, use only one grid for each individual table and not a grid for each row. If no grid is used, use tabs, not spaces, to align columns. The electronic text should be prepared in a way very similar to that of conventional manuscripts (see also the [Guide to Publishing with Elsevier](#)). Note that source files of figures, tables and text graphics will be required whether or not you embed your figures in the text. See also the section on Electronic artwork.

To avoid unnecessary errors you are strongly advised to use the 'spell-check' and 'grammar-check' functions of your word processor.

Article structure

Subdivision

Divide your article into clearly defined sections. Each subsection is given a brief heading. Each heading should appear on its own separate line. Subsections should be used as much as possible when cross-referencing text: refer to the subsection by heading as opposed to simply 'the text'.

The text, in the case of original articles, will generally be: Introduction, Material and Methods, Results, Discussion and Conclusions.

Introduction

State the objectives of the work and provide an adequate background, avoiding a detailed literature survey or a summary of the results.

Material and methods

Provide sufficient details to allow the work to be reproduced by an independent researcher. Methods that are already published should be summarized, and indicated by a reference. If quoting directly from a previously published method, use quotation marks and also cite the source. Any modifications to existing methods should also be described.

Results

Results should be clear and concise.

Discussion

This should explore the significance of the results of the work, not repeat them. A combined Results and Discussion section is often appropriate. Avoid extensive citations and discussion of published literature.

Conclusions

The main conclusions of the study may be presented in a short Conclusions section, which may stand alone or form a subsection of a Discussion or Results and Discussion section.

Appendices

If there is more than one appendix, they should be identified as A, B, etc. Formulae and equations in appendices should be given separate numbering: Eq. (A.1), Eq. (A.2), etc.; in a subsequent appendix, Eq. (B.1) and so on. Similarly for tables and figures: Table A.1; Fig. A.1, etc.

Essential title page information

- **Title.** Concise and informative. Titles are often used in information-retrieval systems. Avoid abbreviations and formulae where possible.
- **Author names and affiliations.** Where the family name may be ambiguous (e.g., a double name), please indicate this clearly. Present the authors' affiliation addresses (where the actual work was done) below the names. Indicate all affiliations with a lower-case superscript letter immediately after the author's name and in front of the appropriate address. Provide the full postal address of each affiliation, including the country name and, if available, the e-mail address of each author. When the number of authors exceeds six, this must be justified.
- **Corresponding author.** Clearly indicate who will handle correspondence at all stages of refereeing and publication, also post-publication. **Ensure that phone numbers (with country and area code) are provided in addition to the e-mail address and the complete postal address. Contact details must be kept up to date by the corresponding author.**
- **Present/permanent address.** If an author has moved since the work described in the article was done, or was visiting at the time, a 'Present address' (or 'Permanent address') may be indicated as a footnote to that author's name. The address at which the author actually did the work must be retained as the main, affiliation address. Superscript Arabic numerals are used for such footnotes.

Abstract

A concise and factual abstract is required. The abstract should state briefly the purpose of the research, the principal results and major conclusions. An abstract is often presented separately from the article, so it must be able to stand alone. For this reason, References should be avoided, but if essential, then cite the author(s) and year(s). Also, non-standard or uncommon abbreviations should be avoided, but if essential they must be defined at their first mention in the abstract itself. It should not exceed 120 words for case reports.

Structured abstract

A structured abstract, by means of appropriate headings, should provide the context or background for the research and should state its purpose, basic procedures (selection of study subjects or laboratory animals, observational and analytical methods), main findings (giving specific effect sizes and their statistical significance, if possible), and principal conclusions. It should emphasize new and important aspects of the study or observations. It should not exceed 250 words for original works.

Keywords

Immediately after the abstract, provide a maximum of 6 keywords, according to the terminology of the Medical Index "Medical Subject Headings". These keywords will be used for indexing purposes.

Abbreviations

Define abbreviations that are not standard in this field in a footnote to be placed on the first page of the article. Such abbreviations that are unavoidable in the abstract must be defined at their first mention there, as well as in the footnote. Ensure consistency of abbreviations throughout the article.

Acknowledgements

Collate acknowledgements in a separate section at the end of the article before the references and do not, therefore, include them on the title page, as a footnote to the title or otherwise. List here those individuals who provided help during the research (e.g., providing language help, writing assistance or proof reading the article, etc.).

Formatting of funding sources

List funding sources in this standard way to facilitate compliance to funder's requirements:

Funding: This work was supported by the National Institutes of Health [grant numbers xxxx, yyyy]; the Bill & Melinda Gates Foundation, Seattle, WA [grant number zzzz]; and the United States Institutes of Peace [grant number aaaa].

It is not necessary to include detailed descriptions on the program or type of grants and awards. When funding is from a block grant or other resources available to a university, college, or other research institution, submit the name of the institute or organization that provided the funding.

If no funding has been provided for the research, please include the following sentence:

This research did not receive any specific grant from funding agencies in the public, commercial, or not-for-profit sectors.

Units

Follow internationally accepted rules and conventions: use the international system of units (SI). If other units are mentioned, please give their equivalent in SI.

Math formulae

Please submit math equations as editable text and not as images. Present simple formulae in line with normal text where possible and use the solidus (/) instead of a horizontal line for small fractional terms, e.g., X/Y. In principle, variables are to be presented in italics. Powers of e are often more conveniently denoted by exp. Number consecutively any equations that have to be displayed separately from the text (if referred to explicitly in the text).

Embedded math equations

If you are submitting an article prepared with Microsoft Word containing embedded math equations then please read this ([related support information](#)).

Artwork

Image manipulation

Whilst it is accepted that authors sometimes need to manipulate images for clarity, manipulation for purposes of deception or fraud will be seen as scientific ethical abuse and will be dealt with accordingly. For graphical images, this journal is applying the following policy: no specific feature within an image may be enhanced, obscured, moved, removed, or introduced. Adjustments of brightness, contrast, or color balance are acceptable if and as long as they do not obscure or eliminate any information present in the original. Nonlinear adjustments (e.g. changes to gamma settings) must be disclosed in the figure legend.

Electronic artwork

General points

- Make sure you use uniform lettering and sizing of your original artwork.
- Embed the used fonts if the application provides that option.
- Aim to use the following fonts in your illustrations: Arial, Courier, Times New Roman, Symbol, or use fonts that look similar.
- Number the illustrations according to their sequence in the text.
- Use a logical naming convention for your artwork files.
- Provide captions to illustrations separately.
- Size the illustrations close to the desired dimensions of the published version.
- Submit each illustration as a separate file.

A detailed [guide on electronic artwork](#) is available.

You are urged to visit this site; some excerpts from the detailed information are given here.

Formats

If your electronic artwork is created in a Microsoft Office application (Word, PowerPoint, Excel) then please supply 'as is' in the native document format.

Regardless of the application used other than Microsoft Office, when your electronic artwork is finalized, please 'Save as' or convert the images to one of the following formats (note the resolution requirements for line drawings, halftones, and line/halftone combinations given below):

EPS (or PDF): Vector drawings, embed all used fonts.

TIFF (or JPEG): Color or grayscale photographs (halftones), keep to a minimum of 300 dpi.

TIFF (or JPEG): Bitmapped (pure black & white pixels) line drawings, keep to a minimum of 1000 dpi.

TIFF (or JPEG): Combinations bitmapped line/half-tone (color or grayscale), keep to a minimum of 500 dpi.

Please do not:

- Supply files that are optimized for screen use (e.g., GIF, BMP, PICT, WPG); these typically have a low number of pixels and limited set of colors;
- Supply files that are too low in resolution;
- Submit graphics that are disproportionately large for the content.

Color artwork

Please make sure that artwork files are in an acceptable format (TIFF (or JPEG), EPS (or PDF), or MS Office files) and with the correct resolution. If, together with your accepted article, you submit usable color figures then Elsevier will ensure, at no additional charge, that these figures will appear in color on the Web (e.g., ScienceDirect and other sites) regardless of whether or not these illustrations are reproduced in color in the printed version.

Please note: Because of technical complications which can arise by converting color figures to 'gray scale' (for the printed version should you not opt for color in print) please submit in addition usable black and white versions of all the color illustrations.

Illustration services

[Elsevier's WebShop](#) offers Illustration Services to authors preparing to submit a manuscript but concerned about the quality of the images accompanying their article. Elsevier's expert illustrators can produce scientific, technical and medical-style images, as well as a full range of charts, tables and graphs. Image 'polishing' is also available, where our illustrators take your image(s) and improve them to a professional standard. Please visit the website to find out more.

Figure captions

Ensure that each illustration has a caption. Supply captions separately, not attached to the figure. A caption should comprise a brief title (**not** on the figure itself) and a description of the illustration. Keep text in the illustrations themselves to a minimum but explain all symbols and abbreviations used.

Tables

Please submit tables as editable text and not as images. Tables can be placed either next to the relevant text in the article, or on separate page(s) at the end. Number tables consecutively in accordance with their appearance in the text and place any table notes below the table body. Be sparing in the use of tables and ensure that the data presented in them do not duplicate results described elsewhere in the article. Please avoid using vertical rules and shading in table cells.

References

Citation in text

Please ensure that every reference cited in the text is also present in the reference list (and vice versa). Any references cited in the abstract must be given in full. Unpublished results and personal communications are not recommended in the reference list, but may be mentioned in the text. If these references are included in the reference list they should follow the standard reference style of the journal and should include a substitution of the publication date with either 'Unpublished results' or 'Personal communication'. Citation of a reference as 'in press' implies that the item has been accepted for publication.

Reference links

Increased discoverability of research and high quality peer review are ensured by online links to the sources cited. In order to allow us to create links to abstracting and indexing services, such as Scopus, CrossRef and PubMed, please ensure that data provided in the references are correct. Please note that incorrect surnames, journal/book titles, publication year and pagination may prevent link creation. When copying references, please be careful as they may already contain errors. Use of the DOI is highly encouraged.

A DOI is guaranteed never to change, so you can use it as a permanent link to any electronic article. An example of a citation using DOI for an article not yet in an issue is: VanDecar J.C., Russo R.M., James D.E., Ambeh W.B., Franke M. (2003). Aseismic continuation of the Lesser Antilles slab beneath northeastern Venezuela. *Journal of Geophysical Research*, <https://doi.org/10.1029/2001JB000884>. Please note the format of such citations should be in the same style as all other references in the paper.

Web references

As a minimum, the full URL should be given and the date when the reference was last accessed. Any further information, if known (DOI, author names, dates, reference to a source publication, etc.), should also be given. Web references can be listed separately (e.g., after the reference list) under a different heading if desired, or can be included in the reference list.

Data references

This journal encourages you to cite underlying or relevant datasets in your manuscript by citing them in your text and including a data reference in your Reference List. Data references should include the following elements: author name(s), dataset title, data repository, version (where available), year, and global persistent identifier. Add [dataset] immediately before the reference so we can properly identify it as a data reference. The [dataset] identifier will not appear in your published article.

References in a special issue

Please ensure that the words 'this issue' are added to any references in the list (and any citations in the text) to other articles in the same Special Issue.

Reference style

Text: Indicate references by superscript numbers in the text. The actual authors can be referred to, but the reference number(s) must always be given.

List: Number the references in the list in the order in which they appear in the text.

Examples:

Reference to a journal publication:

1. Van der Geer J, Hanraads JAJ, Lupton RA. The art of writing a scientific article. *J Sci Commun*. 2010;**163**:51–9.

Reference to a book:

2. Strunk Jr W, White EB. *The elements of style*. 4th ed. New York: Longman; 2000.

Reference to a chapter in an edited book:

3. Mettam GR, Adams LB. How to prepare an electronic version of your article. In: Jones BS, Smith RZ, editors. *Introduction to the electronic age*, New York: E-Publishing Inc; 2009, p. 281–304.

Note shortened form for last page number. e.g., 51–9, and that for more than 6 authors the first 6 should be listed followed by 'et al.'

In manuscripts signed by more than 6 authors (3 authors in the case of letters to the editor), there has to be an explicit explanation for such an extensive authorship. For further details you are referred to 'Uniform Requirements for Manuscripts submitted to Biomedical Journals' (*J Am Med Assoc* 1997;**277**:927–34) (see also http://www.nlm.nih.gov/bsd/uniform_requirements.html).

Journal abbreviations source

Journal names should be abbreviated according to the [List of Title Word Abbreviations](#).

Video

Elsevier accepts video material and animation sequences to support and enhance your scientific research. Authors who have video or animation files that they wish to submit with their article are strongly encouraged to include links to these within the body of the article. This can be done in the same way as a figure or table by referring to the video or animation content and noting in the body text where it should be placed. All submitted files should be properly labeled so that they directly relate to the video file's content. . In order to ensure that your video or animation material is directly usable, please provide the file in one of our recommended file formats with a preferred maximum size of 150 MB per file, 1 GB in total. Video and animation files supplied will be published online in the electronic version of your article in Elsevier Web products, including [ScienceDirect](#). Please supply 'stills' with your files: you can choose any frame from the video or animation or make a separate image. These will be used instead of standard icons and will personalize the link to your video data. For more detailed instructions please visit our [video instruction pages](#). Note: since video and animation cannot be embedded in the print version of the journal, please provide text for both the electronic and the print version for the portions of the article that refer to this content.

Supplementary material

Supplementary material such as applications, images and sound clips, can be published with your article to enhance it. Submitted supplementary items are published exactly as they are received (Excel or PowerPoint files will appear as such online). Please submit your material together with the article and supply a concise, descriptive caption for each supplementary file. If you wish to make changes to supplementary material during any stage of the process, please make sure to provide an updated file. Do not annotate any corrections on a previous version. Please switch off the 'Track Changes' option in Microsoft Office files as these will appear in the published version.

Research data

This journal encourages and enables you to share data that supports your research publication where appropriate, and enables you to interlink the data with your published articles. Research data refers to the results of observations or experimentation that validate research findings. To facilitate reproducibility and data reuse, this journal also encourages you to share your software, code, models, algorithms, protocols, methods and other useful materials related to the project.

Below are a number of ways in which you can associate data with your article or make a statement about the availability of your data when submitting your manuscript. If you are sharing data in one of these ways, you are encouraged to cite the data in your manuscript and reference list. Please refer to the "References" section for more information about data citation. For more information on depositing, sharing and using research data and other relevant research materials, visit the [research data](#) page.

Data linking

If you have made your research data available in a data repository, you can link your article directly to the dataset. Elsevier collaborates with a number of repositories to link articles on ScienceDirect with relevant repositories, giving readers access to underlying data that gives them a better understanding of the research described.

There are different ways to link your datasets to your article. When available, you can directly link your dataset to your article by providing the relevant information in the submission system. For more information, visit the [database linking page](#).

For [supported data repositories](#) a repository banner will automatically appear next to your published article on ScienceDirect.

In addition, you can link to relevant data or entities through identifiers within the text of your manuscript, using the following format: Database: xxxx (e.g., TAIR: AT1G01020; CCDC: 734053; PDB: 1XFN).

Mendeley Data

This journal supports Mendeley Data, enabling you to deposit any research data (including raw and processed data, video, code, software, algorithms, protocols, and methods) associated with your manuscript in a free-to-use, open access repository. During the submission process, after uploading your manuscript, you will have the opportunity to upload your relevant datasets directly to *Mendeley Data*. The datasets will be listed and directly accessible to readers next to your published article online.

For more information, visit the [Mendeley Data for journals page](#).

Data statement

To foster transparency, we encourage you to state the availability of your data in your submission. This may be a requirement of your funding body or institution. If your data is unavailable to access or unsuitable to post, you will have the opportunity to indicate why during the submission process, for example by stating that the research data is confidential. The statement will appear with your published article on ScienceDirect. For more information, visit the [Data Statement page](#).

Submission checklist

The following list will be useful during the final checking of an article prior to sending it to the journal for review. Please consult this Guide for Authors for further details of any item.

Ensure that the following items are present:

One author has been designated as the corresponding author with contact details:

- E-mail address
- Full postal address
- Phone numbers

All necessary files have been uploaded, and contain:

- Keywords
- All figure captions
- All tables (including title, description, footnotes)

Further considerations

- Manuscript has been 'spell-checked' and 'grammar-checked'
- References are in the correct format for this journal
- All references mentioned in the Reference list are cited in the text, and vice versa
- Permission has been obtained for use of copyrighted material from other sources (including the Web).
- If only color on the Web is required, black-and-white versions of the figures are also supplied for printing purposes

For any further information please visit our customer support site at <http://support.elsevier.com>.

AFTER ACCEPTANCE

Proofs

One set of page proofs (as PDF files) will be sent by e-mail to the corresponding author (if we do not have an e-mail address then paper proofs will be sent by post) or, a link will be provided in the e-mail so that authors can download the files themselves. Elsevier now provides authors with PDF

proofs which can be annotated; for this you will need to [download the free Adobe Reader](#), version 9 (or higher). Instructions on how to annotate PDF files will accompany the proofs (also given online). The exact system requirements are given at the [Adobe site](#).

If you do not wish to use the PDF annotations function, you may list the corrections (including replies to the Query Form) and return them to Elsevier in an e-mail. Please list your corrections quoting line number. If, for any reason, this is not possible, then mark the corrections and any other comments (including replies to the Query Form) on a printout of your proof and scan the pages and return via e-mail. Please use this proof only for checking the typesetting, editing, completeness and correctness of the text, tables and figures. Significant changes to the article as accepted for publication will only be considered at this stage with permission from the Editor. We will do everything possible to get your article published quickly and accurately. It is important to ensure that all corrections are sent back to us in one communication: please check carefully before replying, as inclusion of any subsequent corrections cannot be guaranteed. Proofreading is solely your responsibility.

Offprints

The corresponding author will be notified and receive a link to the published version of the open access article on [ScienceDirect](#). This link is in the form of an article DOI link which can be shared via email and social networks. For an extra charge, paper offprints can be ordered via the offprint order form which is sent once the article is accepted for publication. Both corresponding and co-authors may order offprints at any time via Elsevier's [Webshop](#). Authors requiring printed copies of multiple articles may use Elsevier Webshop's 'Create Your Own Book' service to collate multiple articles within a single cover.

AUTHOR INQUIRIES

Visit the [Elsevier Support Center](#) to find the answers you need. Here you will find everything from Frequently Asked Questions to ways to get in touch.

You can also [check the status of your submitted article](#) or find out [when your accepted article will be published](#).

© Copyright 2018 Elsevier | <https://www.elsevier.com>